



**VIABILIDADE BIOLÓGICA DA HIDROXIAPATITA OBTIDA DO RESÍDUO DE
PESCADO PARA USO EM ENXERTO ÓSSEO**

PEDRO LUIZ MENIN RUIZ

SANTOS, 2017

PEDRO LUIZ MENIN RUIZ

**VIABILIDADE BIOLÓGICA DA HIDROXIAPATITA OBTIDA DO RESÍDUO DE
PESCADO PARA USO EM ENXERTO ÓSSEO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de São Paulo Campus Baixada
Santista como parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel A. Ribeiro

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana C. M. Rennó

SANTOS, 2017

*Dedico este trabalho à toda equipe do
Laboratório de Toxicogenômica.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer ao meu pai que, através de sua vida de caminhoneiro, sustentou meu sonho de cursar uma universidade pública e de qualidade.

Quero agradecer à Universidade Federal de São Paulo Campus Baixada Santista por todo o conhecimento adquirido durante a minha graduação, e à todas as amizades que aqui realizei.

Agradecer, especialmente, ao meu grupo de estágio Giovanna, Letícia, Mayra e Tatiana, e aos agregados Carla e Carol, que me acompanharam e me “aguentaram” durante esse último ano de graduação – cada ciclo de estágio terminado era a nossa maior conquista, e sempre celebrávamos!

Agradecer ao Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro, pela oportunidade de poder participar deste belíssimo projeto, e aos meus companheiros do laboratório: Bianca de Andrade, Carolina Foot, Caroline Margonato, Flávia Pidone, Gláucia Resende, Samuel Cláudio, Veronika Yura e Vitor Hugo.

E finalmente, quero agradecer à cidade de Santos, que apesar de todas as dificuldades que aqui encontrei, consegui superá-las – algumas com facilidade, e outras com dificuldade. Todo sacrifício fez parte da minha construção, fazendo-me quem sou hoje.

RESUMO

Introdução: O peixe é um alimento muito apreciado pela população mundial e seu consumo vem sendo estimulado por nutricionistas e médicos por possuir alto teor proteico, nutritivo e mineral. Devido seu crescente consumo nas últimas décadas, o resíduo gerado tem sido elevado sem nenhuma utilização comercial.

Objetivo: O objetivo do estudo foi avaliar a viabilidade biológica da hidroxiapatita obtida do resíduo de corvina (*Micropogonias furnieri*) *in vivo* para futura aplicação como enxerto ósseo em escala comercial.

Metodologia: Para avaliar a biocompatibilidade da HAP de corvina foram realizados dois testes de biocompatibilidade. Foram utilizados 32 ratos Wistar e distribuídos aleatoriamente em 4 grupos, sendo 16 animais para o teste do subcutâneo (CTL, SUB 7, SUB 15 e SUB 30) e 16 animais para o teste da calvária (CTL, CAL 7, CAL 15 e CAL 30). Após cada período experimental (7, 15 e 30 dias) os animais foram eutanasiados e o material foi coletado para confecção de lâminas para avaliação histopatológica do sítio de implantação.

Resultados: Na análise histopatológica do teste do subcutâneo foi observado presença de processo inflamatório 7 e 15 dias após o implante e diminuição da área de biomaterial implantado, com aumento da presença de células gigantes 30 dias após o implante. Na análise histopatológica do teste da calvária foi observado presença de processo inflamatório 7 e 15 dias após o implante e consolidação óssea 30 dias após o implante.

Discussão: Diversos estudos buscam superar as desvantagens dos enxertos autógenos na consolidação de fraturas ósseas. Biomateriais como a HAP bovina (*Bio-Oss*) já é consolidado como enxerto ósseo. No entanto, o nosso novo biomaterial busca o reaproveitamento do resíduo descartado de pescado para utilização como enxerto ósseo na prática clínica.

Conclusão: A HAP de origem de pescado parece ser biocompatível *in vivo*, uma vez que permitiu o remodelamento tecidual no teste do subcutâneo e a consolidação óssea no teste da calvária, sem provocar danos teciduais locais.

Palavras-chave: biocompatibilidade, hidroxiapatita, enxerto ósseo.

ABSTRACT

Introduction: Fish is a food very appreciated by the world population and its consumption has been stimulated by nutritionists and doctors because it has high protein, nutritive and mineral content. Due to its increasing consumption in recent decades, the waste generated has been raised without any commercial use.

Objective: The objective of the study was to evaluate the biological viability of the hydroxyapatite obtained from the corvina (*Micropogonias furnieri*) residue in vivo for future application as a commercial scale bone graft.

Methodology: Two biocompatibility tests were performed to evaluate the biocompatibility of PAH of corvina. Thirty-two Wistar rats were randomly assigned to 4 groups, 16 of which were animals for the subcutaneous (CTL, SUB 7, SUB 15 and SUB 30) and 16 animals for the calvaria test (CTL, CAL 7, CAL 15 and CAL 30). After each experimental period (7, 15 and 30 days) the animals were euthanized and the material was collected for the preparation of slides for histopathological evaluation of the implantation site.

Results: In the histopathological analysis of the subcutaneous test, the presence of an inflammatory process was observed 7 and 15 days after the implant and a decrease in the area of implanted biomaterial, with an increase in the presence of giant cells 30 days after implantation. In the histopathological analysis of the calvaria test, an inflammatory process was observed 7 and 15 days after implant and bone consolidation 30 days after the implant.

Discussion: Several studies seek to overcome the disadvantages of autogenous grafts in the consolidation of bone fractures. Biomaterials such as bovine PAH (Bio-Oss) is already consolidated as a bone graft. However, our new biomaterial seeks the reuse of discarded fish residue for use as a bone graft in clinical practice.

Conclusion: HAP from fish origin appears to be biocompatible in vivo, since it allowed the tissue remodeling in the subcutaneous test and bone healing in the calvaria test, without causing local tissue damage.

Keywords: biocompatibility, hydroxyapatite, bone graft.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mercado Municipal de Peixes de Santos, Ponta da Praia. Foto tirada em 26 de maio de 2016.

Figura 2. Estrutura molecular da HAP.

Figura 3. Tratamento da ossada de corvina com hidróxido de sódio (NaOH) após 12 horas (A), seguida pelo tratamento com peróxido de oxigênio (H₂O₂) após 12 horas (B) e as amostras resultantes do processo de calcinação a 800 °C após 5 horas (C).

Figura 4. Esquema representativo do delineamento do teste do subcutâneo. Implante de HAP (◄) e eutanásia (†) dos grupos.

Figura 4. Esquema representativo do delineamento do teste do subcutâneo. Implante de HAP (◄) e eutanásia (†) dos grupos.

Figura 6. Procedimento para realização do defeito ósseo sugerido por Spicer e colaboradores (2012). Tricotomia e assepsia (A), incisão linear na direção occipito-frontal para exposição do osso (B), realização do defeito com broca trefina (C) e defeito de 5,0 mm na calvária para preenchimento com biomaterial (D).

Figura 7. Fotomicrografia do tecido subcutâneo corados com hematoxilina-eosina dos grupos CTL (A), SUB 7 (B), SUB 15 (C) e SUB 30 (D). Hidroxiapatita (#), vasos sanguíneos (►), células gigantes multinucleadas (►), infiltrado inflamatório (IN) e cápsula fibrosa (CF). Microscópio Leica®, aumento de 200x.

Figura 8. Fotomicrografias da calvária corados com hematoxilina-eosina dos grupos CTL (A), CAL 7 (B), CAL 15 (C) e CAL 30 (D). Tecido ósseo neoformado (*), hidroxiapatita (#), vasos sanguíneos (►), células gigantes multinucleadas (►), infiltrado inflamatório (IN) e cápsula fibrosa (CF). Microscópio Leica®, aumento de 200x.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAL – Calvária

CEDEME – Centro de Modelos Experimentais

CG – Células gigantes multinucleadas

CF – Cápsula fibrosa

CTL – Controle

HAP – Hidroxiapatita

IN – Infiltrado inflamatório

ISO – International Organization for Standardization

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

SUB – Subcutâneo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. O consumo de peixe e o resíduo gerado	8
1.2. Mercado Municipal de Peixes de Santos	8
1.3. HAP do resíduo de pescado.....	9
1.4. Utilização de biomateriais como substitutos ósseos.....	11
1.5. Validação de materiais biocompatíveis	12
2. OBJETIVO	13
3. HIPÓTESE	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1. Obtenção da HAP proveniente do resíduo de corvina (<i>Micropogonias furnieri</i>)	15
4.1.1. Coleta e lavagem do resíduo de pescado	15
4.1.2. Processo de desproteinização	15
4.1.3. Tratamento térmico.....	15
4.2. Avaliação de biocompatibilidade <i>in vivo</i>	16
4.2.1. Teste do subcutâneo.....	16
4.2.2. Teste da calvária	17
4.3. Eutanásia.....	19
4.4. Coleta de material biológico.....	19
4.5. Análise histopatológica	19
4.6. Comitê de Ética	19
5. RESULTADOS	20
5.1. Teste do subcutâneo.....	20
5.2. Teste da calvária	21
6. DISCUSSÃO	23
7. CONCLUSÃO.....	25
8. REFERÊNCIAS	26
9. ANEXOS	29

1. INTRODUÇÃO

1.1. O consumo de peixe e o resíduo gerado

Atualmente, o peixe é um alimento muito procurado pela população devido às suas qualidades nutricionais. O seu consumo vem sendo constantemente estimulado por nutricionistas e médicos por possuir alto valor nutritivo, proteínas com balanceamento de aminoácidos essenciais e lipídios ricos em ácidos graxos insaturados (Ogawa, 1999). Por conter alto teor proteico e nutrientes, tais como a vitamina D, minerais como o magnésio, manganês, zinco, cobre e selênio, além da gordura ômega-3, alguns autores tais como Ogawa (1999) e Suzuki (2002) atribuíram uma redução de 36% no risco de morte por doenças coronarianas ao consumo de 340 g por semana de peixe.

Numa estimativa entre 2003 a 2010, a produção brasileira de pescado aumentou 25%, passando para 1240 ton/ano (SEBRAE, 2011). De acordo com a estatística pesqueira do Instituto de Pesca em 2011, a produção da pesca extrativa marinha do Estado de São Paulo foi de 24 mil toneladas, que corresponde a 4,7% da pesca do Brasil. As espécies de peixe mais comercializadas na região foram a corvina e a sardinha.

Em virtude da crescente demanda deste alimento, o resíduo gerado em decorrência de seu consumo tem também sido elevado, com valores entre 18-30 milhões de toneladas de resíduo em todo o mundo (Ferraro *et al.*, 2007). Os subprodutos provenientes do processamento, tais como a filetagem, salga e cura geram a maior quantidade de resíduo sólido, em torno de 50 a 75% em relação ao pescado bruto (Ferraro *et al.*, 2007).

1.2. Mercado Municipal de Peixes de Santos

Um dos principais pontos de venda da cidade de Santos é o Mercado Municipal do Peixe (Figura 1), que recebe parte da captura da região e pescados proveniente do sul do país. Produz quantidade significativa de resíduos sólidos provenientes das espécies comercializadas na forma de filé e são descartados sem tratamento. Embora não existam dados oficiais sobre o volume de resíduo gerado diariamente no Mercado Municipal do Peixe de Santos, estima-se que quantidade de resíduo descartado ao dia por “box” seja em aproximadamente 1500 kg/dia, podendo este valor triplicar na época da temporada (entre dezembro e fevereiro). Durante a realização da estimativa do volume de venda em 2009, os comerciantes indicaram a pescada

amarela em primeiro lugar, seguida de corvina, linguado e robalo como as espécies mais comercializadas na forma de filé.



Figura 1. Mercado Municipal de Peixes de Santos, litoral paulista. Foto tirada em 26 de maio de 2016.

Até o momento, não existe um procedimento comercialmente viável para o aproveitamento dos resíduos gerados no Mercado Municipal de Santos, sendo estes descartados provavelmente em aterro sanitário destinado para resíduos urbanos. Tal procedimento pode causar sérios problemas no que tange ao impacto ambiental por serem extremamente poluentes (Arruda, 2004). Felizmente, os resíduos da industrialização do pescado podem ser aproveitados de várias formas, sendo divididos em quatro categorias: alimento para consumo humano; ração animal; fertilizante e produtos químicos. No Brasil, a maior parte do resíduo de pescado, quando reaproveitada, é destinada à produção de farinha de pescado, utilizada como ingrediente de ração animal (Arruda, 2004).

1.3. Hidroxiapatita (HAP) do resíduo de pescado

O osso do pescado pode ser separado, após a remoção da proteína do músculo da carcaça, sendo uma fonte valiosa de composto promotor de saúde. O material orgânico do osso do pescado contém aproximadamente 30% de colágeno, sendo o restante um material de caráter inorgânico, composto principalmente de hidroxiapatita (HAP). Trabalhos recentes têm sido introduzidos para o aproveitamento da HAP de origem de pescados, em aplicações

médicas e dentárias, para soluções de problemas relacionados a fraturas e enxertos (Kim & Mendis, 2006).

Quimicamente, as apatitas são fontes naturais de fósforo da classe dos fosfatos de cálcio representada pela seguinte fórmula molecular: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$, sendo $\text{X} = \text{OH}, \text{F}, \text{Cl}$, etc. As rochas de apatitas são fontes de matéria-prima para a produção de compostos de fósforos e seus derivados. A HAP apresenta estrutura cristalina hexagonal (Figura 2), estando presente em ossos e dentes na forma de hidrofosfato de cálcio com aproximadamente 30% a 70% do total (Costa *et al.*, 2009).

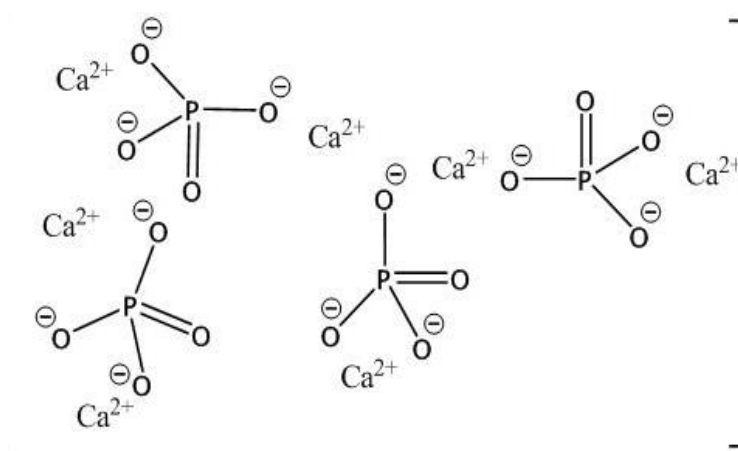


Figura 2. Estrutura molecular da hidroxiapatita (HAP).

Há décadas, a HAP vem sendo utilizada como biocerâmica na área da medicina e odontologia, tendo excelente biocompatibilidade e osteointegração com o tecido humano, sendo amplamente utilizada em próteses e implantes dentários, ortopedia, cirurgia maxilofacial entre outros (Kirk-Othmer, 2006; Costa *et al.*, 2009). Devido à sua alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas, a HAP torna-se um excelente suporte para ação prolongada de quimioterápicos no tratamento de tumores ósseos, e também eficiente no tratamento de remoção de metais pesados em águas e solos poluídos (Prabakaran *et al.*, 2006) (Araújo *et al.*, 2006). Além dessas características, não apresenta toxidez, características inflamatórias ou mesmo imunodeficiência.

Ozawa e Suzuki (2002) observaram microestrutura em HAP proveniente de resíduo de peixe submetido a um tratamento térmico à 1300 °C determinado por meio de microscopia eletrônica de transmissão. Os cristais formados entre 800 °C a 1000 °C apresentaram partículas entre 200 a 500 nm. As nanopartículas são favorecidas para a osteointegração com o tecido humano (FENG *et al.*, 2005).

Por outro lado, Itoh e colaboradores (2006) testaram implantes com cerâmica de HAP submetida à polarização elétrica com bons resultados. Outros estudos sobre polarização elétrica em partículas de HAP para uso em aplicações ósseas foram também realizados por Iwasaki e colaboradores (2008).

Ohba e colaboradores (2012) desenvolveram técnicas de obtenção de polarização elétrica em HAP e confirmaram que a osteointegração com o produto polarizado é acelerada.

1.4. Utilização de biomateriais como substitutos ósseos

Os materiais biocompatíveis ou biomateriais podem ser de origem natural ou sintética, e são utilizadas para substituir parte de um tecido. Os biomateriais servem como matrizes para a formação de tecido; sua superfície promove a adesão celular, proliferação e diferenciação, bem como resistência mecânica e osteocondução (Eldesoqi *et al.*, 2013). A osteoindução é uma parte do processo de reparo do osso normal e é responsável pela maior parte do osso recém-formado. A osteocondução também ocorre durante a remodelação óssea normal e depende não só de fatores biológicos, mas também da resposta a um material não-próprio do hospedeiro (Roffi *et al.*, 2013).

Substitutos ósseos podem ser classificados em enxertos ósseos (autoenxerto, aloenxerto ou xenoenxerto), cerâmicos (hidroxiapatita, TCP, sulfato de cálcio) e fatores de crescimento (DBM, PRP, BMP's). O substituto ósseo ideal deve ser biocompatível e não evocar qualquer resposta inflamatória adversa. Deve ser osteocondutor, osteoindutor e reabsorvível. Além disso, o substituto de osso ideal deve ser não condutor termicamente, esterilizável, e prontamente disponíveis a um custo razoável (Campana *et al.*, 2014).

A reparação ou consolidação óssea de fraturas ocorre pelos processos de ossificação intramembranosa (Vieira *et al.*, 2015) ou endocondral (Hinton *et al.*, 2016). O resultado final desse processo é a produção de uma matriz, cuja ossificação restaura as propriedades mecânicas normais do osso (Rosset, Deschaseaux & Layrolle, 2014).

Para restauração de defeitos ósseos na medicina e a odontologia, utilizam-se como procedimento padrão-ouro o enxerto autógeno (Nkenke & Neukam, 2014). No entanto, o enxerto autógeno possui algumas limitações, pois a quantidade de osso colhido é limitada e requer uma cirurgia adicional (Lee *et al.*, 2013). Diante desse problema, os biomateriais biocompatíveis obtidos por meio de processos químicos são uma alternativa viável em relação ao enxerto autógeno (Jitaru *et al.*, 2016).

1.5. Validação de materiais biocompatíveis

A avaliação biológica dos biomateriais é realizada por meio de testes que analisam a biocompatibilidade do material. Segundo o Simpósio “*Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*”, o termo biocompatibilidade significa a capacidade de um material em desempenhar uma resposta apropriada em um hospedeiro por meio de uma aplicação específica (ISO 10993-1).

A biocompatibilidade é um dos requisitos primordiais de um biomaterial. Dessa forma, o biomaterial não pode ser alterado pelo meio biológico do organismo hospedeiro tampouco ocasionar dano nos tecidos locais. Como exemplo de alterações causadas nos biomateriais, poder-se-ia citar a corrosão em metais e cerâmicas, e a degradação de polímeros pelos fluidos corpóreos. Já como efeitos biológicos adversos, destacam-se a necrose ou danos aos tecidos circunjacentes, reações celulares, infecções e casos de hipersensibilidade, toxicidade e/ou carcinogenicidade (ISO 10993-1).

A avaliação biológica deve seguir as normas da ISO (*International Organization for Standardization*) 10.993, pois esta oferece informações importantes para um planejamento adequado do projeto. Este padrão internacional foi preparado pelo *Technical Committee ISO/TC 194, Biological evaluation of medical and dental materials and devices* (ISO 10993-1).

Os testes de efeitos locais após a implantação (ISO 10993-6) são realizados com a introdução do biomaterial no animal de laboratório e se avaliam os efeitos no tecido vivo adjacente. Observa-se o efeito celular local que ocorre em resposta à presença do material que pode ser quase inerte, com pouquíssima mobilização celular, até uma resposta celular aguda severa com necrose prolongada por semanas.

A norma ISO 10993-6 menciona o uso de ratos, camundongos, porquinhos da índia e coelhos devido ao tamanho reduzido e ao fácil manuseio. Normalmente, utiliza-se o leito subcutâneo como sítio cirúrgico, mas também podem ser utilizados tecidos específicos como osso, músculo, tecido nervoso, etc para uma avaliação mais apropriada. Após intervalo de tempo variável de dias a meses, o material e o tecido adjacente passam por uma biópsia e subsequente avaliação histopatológica para a observação da resposta tecidual frente ao desafio biológico proposto pelo material em questão.

2. OBJETIVO

O trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade biológica da HAP obtida do resíduo de corvina (*Micropogonias furnieri*) para ser utilizada como enxerto ósseo. Para isso, foram realizados os seguintes testes de biocompatibilidade:

- Teste no tecido subcutâneo;
- Teste no tecido ósseo.

3. HIPÓTESE

Os testes de biocompatibilidade propostos neste estudo contribuirão para constatar a biocompatibilidade da HAP de corvina. Sendo assim, permitirá o desenvolvimento de novas pesquisas com o biomaterial, visando sua aplicação clínica e futura produção em escala comercial.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção da HAP proveniente do resíduo de corvina (*Micropogonias furnieri*)

4.1.1. Coleta e lavagem do resíduo de pescado

Os resíduos de corvina, que é a matéria prima para obtenção de HAP biocompatível, resultantes da filetagem, foram coletados no Mercado Municipal de Peixes da cidade de Santos, litoral do estado de São Paulo. Para obtenção de HAP biocompatível, os resíduos ósseos passaram por uma etapa de lavagem intensa com água e produtos químicos.

4.1.2. Processo de desproteinização

Para desproteinização, foram testados vários procedimentos como tratamento alcalino com hidróxido de sódio em diversas concentrações nos ossos previamente submetidos ao tratamento enzimático ou fermentação láctica. Foi testado um tratamento direto no resíduo de peixe filetado com agentes alcalinos, tais como o hidróxido de sódio e agentes oxidantes.

4.1.3. Tratamento térmico

O tratamento térmico, após a lavagem com os reagentes supracitados, foi realizado a temperaturas de calcinação à 800 °C para a obtenção da HAP de melhor qualidade para execução dos testes de biocompatibilidade.

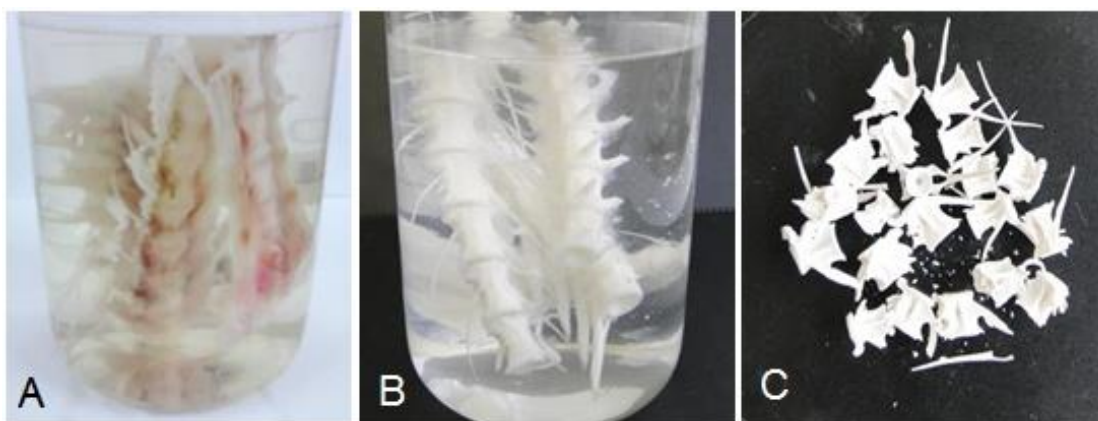


Figura 3. Tratamento da ossada de corvina com hidróxido de sódio (NaOH) após 12 horas (A), seguida pelo tratamento com peróxido de oxigênio (H₂O₂) após 12 horas (B) e as amostras resultantes do processo de calcinação a 800 °C após 5 horas (C).

4.2. Avaliação de biocompatibilidade *in vivo*

4.2.1. Teste no tecido subcutâneo

Para esse teste foram utilizados 16 ratos machos da linhagem Wistar, com três meses de idade e com massa corporal de 250 ± 50 g provenientes do Centro de Modelos Experimentais (CEDEME) da UNIFESP Campus São Paulo. Os animais permaneceram em biotério do Departamento de Biociências da UNIFESP Campus Baixada Santista, em gaiolas de polipropileno padrão, mantidos em ambiente higienizado com regime de luz de 12/12 horas e temperatura controlada a 22 ± 2 °C, com regime livre de água filtrada e ração comercial.

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, nos seguintes grupos, composto por 4 animais:

- **Implante no subcutâneo – 7 dias (SUB 7):** os animais foram eutanasiados no 7º dia após a implantação de HAP no subcutâneo;
- **Implante no subcutâneo – 15 dias (SUB 15):** os animais foram eutanasiados no 15º dia após a implantação de HAP no subcutâneo;
- **Implante no subcutâneo – 30 dias (SUB 30):** os animais foram eutanasiados no 30º dia após a implantação de HAP no subcutâneo;
- **Controle (CTL):** os animais receberam injeção com solução fisiológica no subcutâneo, sendo eutanasiados no final do período experimental.

Para implantação do biomaterial no subcutâneo dos animais, os mesmos foram anestesiados com o anestésico inalatório Halotano® (Cristalia, SP, Brazil) até a completa perda da consciência. Foi feita a incisão no dorso lateral do animal e introduzido o biomaterial em formato de pastilha com $0,5 \text{ cm}^2$ e, em seguida a incisão foi suturada. Os animais do grupo controle receberam injeção de soro fisiológico no subcutâneo.

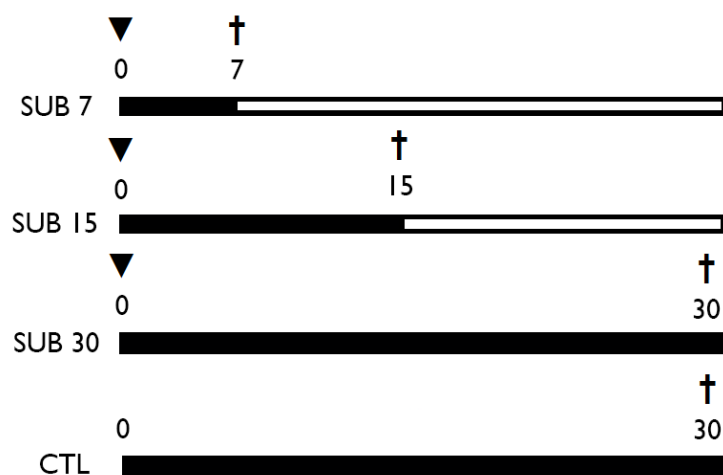


Figura 4. Esquema representativo do delineamento do teste do subcutâneo. Implante de HAP (▼) e eutanásia (†) dos grupos.

4.2.2. Teste da calvária

Foram utilizados 16 ratos machos da linhagem Wistar, com três meses de idade e com massa corporal de 250 ± 50 g provenientes do Centro de Modelos Experimentais (CEDEME) da UNIFESP Campus São Paulo. Os animais permaneceram no biotério do Departamento de Biociências da UNIFESP Campus Baixada Santista em gaiolas de polipropileno padrão, mantidos em ambiente higienizado com regime de claro/escuro de 12/12 horas e temperatura controlada a $22 \pm 2^\circ \text{C}$, com regime livre de água e ração.

Os animais utilizados neste estudo foram distribuídos, aleatoriamente, nos seguintes grupos, composto por 4 animais cada:

- **Implante na calvária – 7 dias (CAL 7):** os animais foram eutanasiados no 7º dia após a implantação de HAP na calvária;
- **Implante na calvária – 15 dias (CAL 15):** os animais foram eutanasiados no 15º dia após a implantação de HAP na calvária;
- **Implante na calvária – 30 dias (CAL 30):** os animais foram eutanasiados no 30º dia após a implantação de HAP na calvária;
- **Controle (CTL):** os animais passaram pelo procedimento para realização do defeito, mas não foram submetidos à implantação de HAP, sendo eutanasiados no final do experimento.

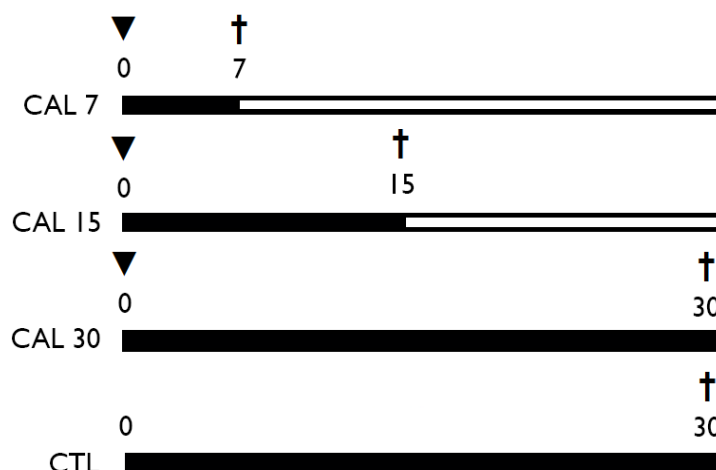


Figura 5. Esquema representativo do delineamento do teste da calvária. Implante de HAP (◄) e eutanásia (†) dos grupos.

O protocolo de lesão (Figura 6) usado foi o sugerido por Spicer e colaboradores (2012). Para implantação do biomaterial na calvária dos animais, os mesmos foram anestesiados com o anestésico inalatório Halotano® (Cristalia, SP, Brazil), até a completa perda da consciência. Para a realização das lesões, foi utilizada uma broca odontológica tipo trefina, da marca WMA (Brasil), com 2,0 cm de comprimento, 5,0 mm de diâmetro externo e acionada por um micromotor da marca BELTEC – Brasil, com rotação de 13.500 rpm, irrigada com soro fisiológico para evitar queimadura do tecido.

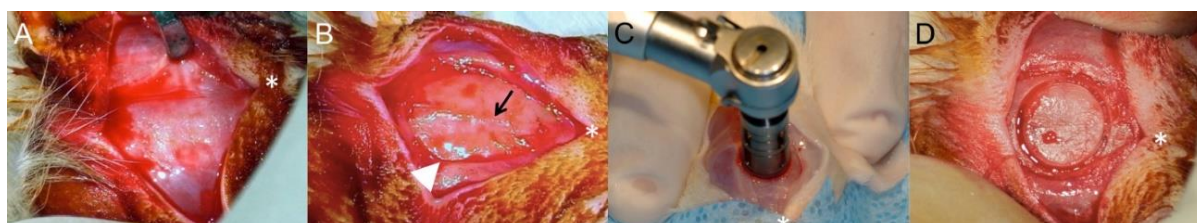


Figura 6. Procedimento para realização do defeito ósseo sugerido por Spicer e colaboradores (2012). Tricotomia e assepsia (A), incisão linear na direção occipito-frontal para exposição do osso (B), realização do defeito com broca trefina (C) e defeito de 5,0 mm na calvária para preenchimento com biomaterial (D).

Após anestesia, tricotomia e assepsia da área a ser operada, os animais sofreram uma incisão na região mediana da cabeça, através da qual foi realizado o defeito ósseo. A lesão foi induzida com a trefina mantida na posição vertical e perpendicular em relação ao eixo longitudinal do osso, de modo a penetrar a cortical para realizar um defeito de 5,0 mm de diâmetro cada.

Nos animais pertencentes aos grupos com hidroxiapatita, o biomaterial foi introduzido no defeito, sendo suturados posteriormente o periósteo e a pele.

4.3. Eutanásia

Para a eutanásia foi realizada anestesia com excesso de solução inalatória Halotano®, seguida de secção cardíaca.

4.4. Coleta de material biológico

Após a eutanásia, os animais tiveram o tecido subcutâneo e o tecido ósseo onde o biomaterial foi implantado e foram fixado em formalina tamponada a 10% por 48 h para confecção de lâminas para análise histopatológica por microscopia de luz

4.5. Análise histopatológica

Foram confeccionadas lâminas com cortes semi-seriados de 5,0 µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina. Depois foi realizada análise morfológica subjetiva do sítio de implantação através da observação das seguintes alterações histopatológicas: infiltrado inflamatório, cápsula fibrosa, proliferação de vasos sanguíneos, células gigantes multinucleadas e degradação do biomaterial.

4.6. Comissão de Ética no Uso Animal

Todos os procedimentos experimentais propostos neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil, sob o número 231.533.

5. RESULTADOS

5.1. Teste do subcutâneo

No grupo SUB 7 foi observado um intenso infiltrado inflamatório com presença moderada de macrófagos e células gigantes multinucleadas. A cápsula fibrosa (CF) ainda se apresentava delgada. No grupo SUB 15, foi observado um aumento do infiltrado inflamatório (IN) com intensa migração leucocitária, composto principalmente por macrófagos e linfócitos, e maior presença de células gigantes multinucleadas (CG). A CF e a proliferação de vasos sanguíneos foram mais marcantes nesse tempo experimental.

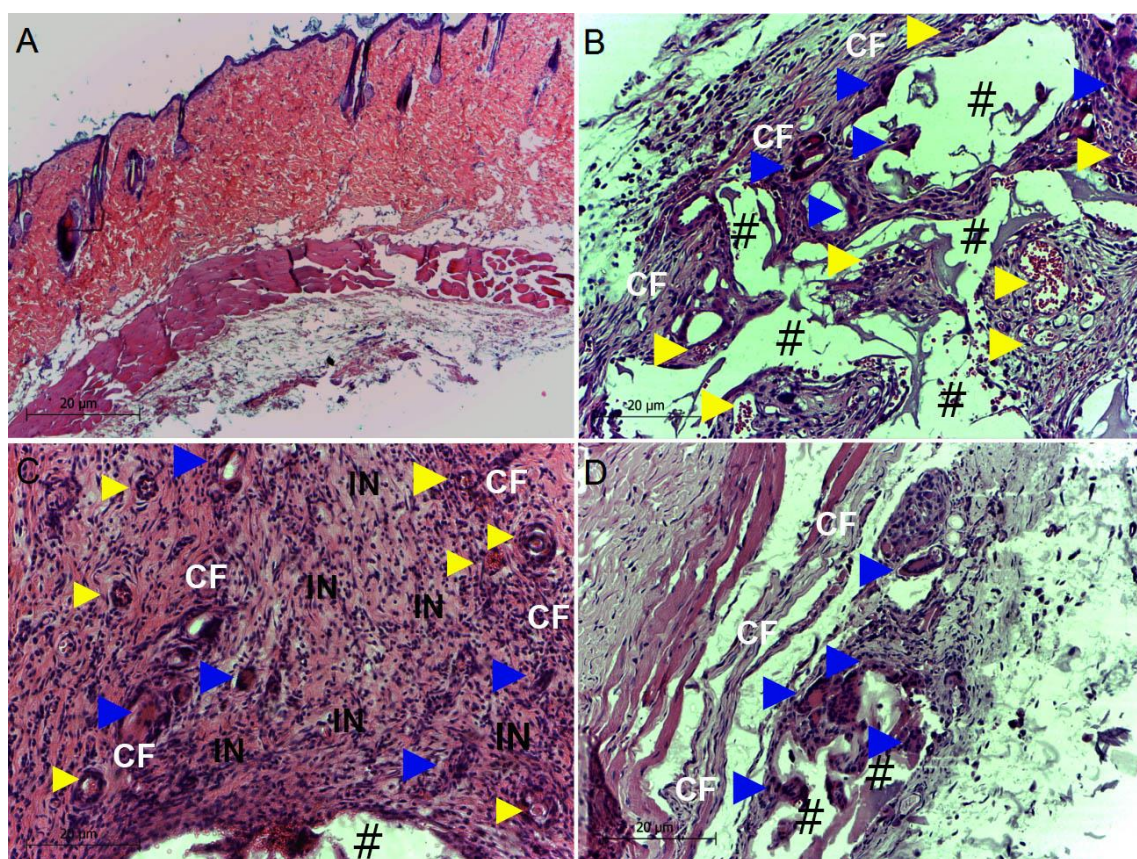


Figura 7. Fotomicrografia do tecido subcutâneo corados com hematoxilina-eosina dos grupos CTL (A), SUB 7 (B), SUB 15 (C) e SUB 30 (D). Hidroxiapatita (#), vasos sanguíneos (▶), células gigantes multinucleadas (▶), infiltrado inflamatório (IN) e cápsula fibrosa (CF). Microscópio Leica®.

O grupo SUB 30, tempo final do experimento, apresentou intensa presença de macrófagos e CG no local de implantação do biomaterial, como também apresentou uma diminuição do IN, quando comparado aos demais tempos experimentais. Houve regressão da CF e dos vasos sanguíneos ao redor do biomaterial no grupo SUB 15. Também foi observado

início de remodelamento tecidual nos animais deste subgrupo. Em relação aos outros tempos experimentais, o volume do biomaterial implantado no subcutâneo foi menor.

O grupo CTL não apresentou alterações histopatológicas. Ademais, nenhum animal apresentou áreas de necrose e atipias celulares detectáveis na microscopia de luz.

5.2. Teste da calvária

Um defeito ósseo é classificado em crítico quando não possui capacidade de reparação espontânea, e em não crítico quando não possui essa capacidade. Na calvária de ratos, um defeito é considerado crítico quando for maior que 8,0 mm de diâmetro e não crítico quando for menor que 8,0 mm (Spicer *et al.*, 2012). Portanto, o defeito de 5,0 mm proposto neste estudo é considerado como não crítico, ou seja, possui capacidade de auto-reparação.

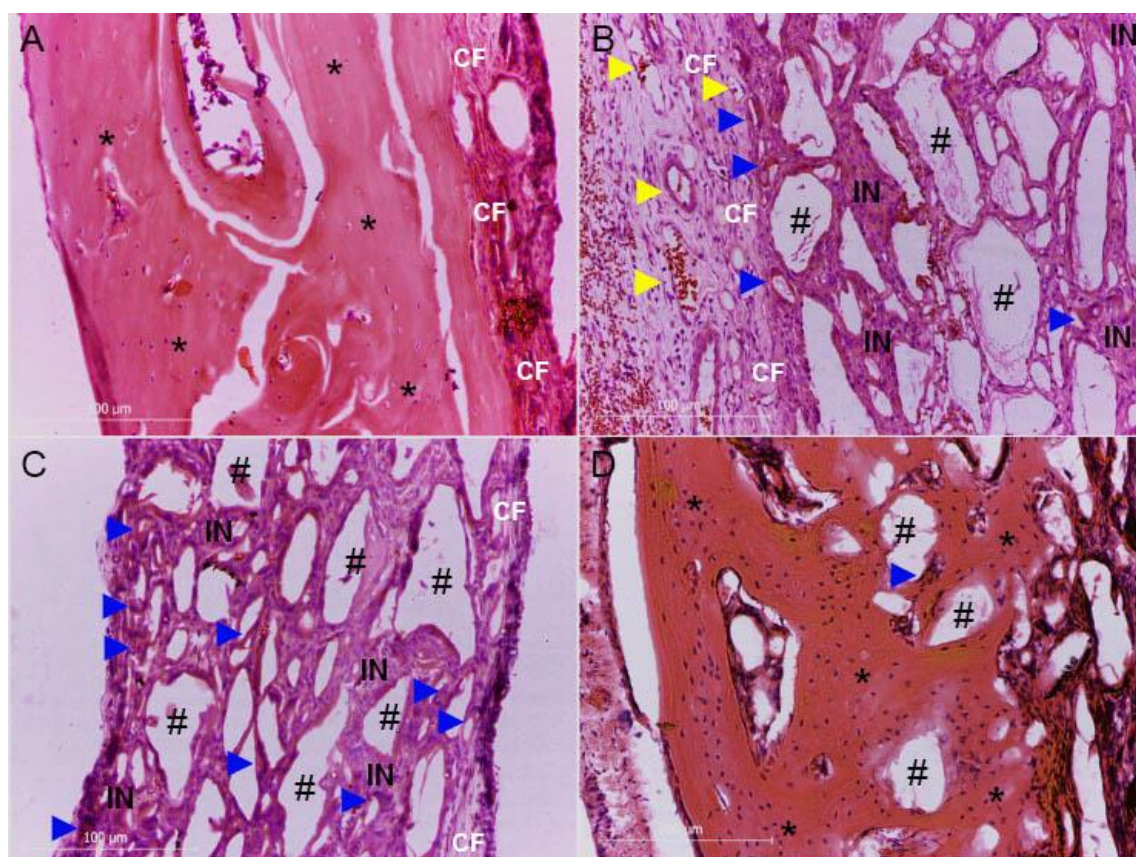


Figura 8. Fotomicrografias da calvária corados com hematoxilina-eosina dos grupos CTL (A), CAL 7 (B), CAL 15 (C) e CAL 30 (D). Tecido ósseo neoformado (*), hidroxipatita (#), vasos sanguíneos (▶), células gigantes multinucleadas (▶), infiltrado inflamatório (IN) e cápsula fibrosa (CF). Microscópio Leica®.

Todos os grupos passaram pela intervenção cirúrgica para a realização do defeito na calvária. Portanto, no grupo CTL, os animais não submetidos à implantação de HAP, apresentaram consolidação óssea. Os animais com implante de HAP, sendo os grupos CAL 7, CAL 15 e CAL 30, apresentaram IN, formação de CP e consolidação óssea.

No grupo CAL 7 foi observado IN moderado a intenso e uma leve proliferação de vasos sanguíneos. Foi observado início da formação da CF e de CG.

O grupo CAL 15 apresentou intensificação do IN, com maior presença de células leucocitárias e intensa proliferação de vasos sanguíneos. Uma maior quantidade de CG foi observada, que foram capazes de absorver a HAP.

Na data final de experimento houve uma diminuição do IN e de células gigantes nos grupos CTL e CAL 30. Além disso, houve também diminuição da quantidade de biomaterial e áreas de tecido ósseo neoformado. Esse padrão foi muito semelhante aquele encontrado no grupo CTL.

6. DISCUSSÃO

Para superar as desvantagens de transplantes autólogos de enxerto ósseo, muitas pesquisas têm focado no desenvolvimento de substitutos ósseos orgânicos e sintéticos. Há disponíveis no mercado e para pesquisas compostos inorgânicos, tais como biossilicato e o biovidro (van Houdt *et al*, 2015). Entretanto, além dos valores nutricionais, peixes têm sido considerados uma fonte importante de biomateriais de colágeno e hidroxiapatita (Mondal *et al*, 2014).

A recuperação e utilização dos resíduos de pescado marinho pode ser uma medida segura para proteção ambiental. Assim, várias alternativas são discutidas, como a produção de ração e silagem (dos Santos, 2000). A corvina também vem sendo pesquisada com a finalidade de ser utilizada em farinhas para alimentação de aves (Enke & Soares, 2016).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a biocompatibilidade da HAP proveniente do resíduo de pescado em modelos experimentais. Após a obtenção da HAP, realizamos o teste *in vivo* no tecido subcutâneo e no tecido ósseo de acordo com as normas da ISO 10993-1, com a finalidade de comprovar que a HAP não provocaria danos locais no tecido, como necrose e atipias celulares, sendo, portanto, exequível para aplicação na clínica.

Observou-se na análise histopatológica que o sítio de implantação do biomaterial no subcutâneo murino desencadeou a resposta inflamatória do tipo granuloma de corpo estranho, com proliferação de fibroblastos, macrófagos e células gigantes multinucleadas (Anderson, Rodriguez & Chang, 2008; Velnar *et al.*, 2016). Outros estudos envolvendo novos biomateriais a base de HAP (Ghanaati *et al.*, 2010; Petrović *et al.*, 2015; Zhong *et al.*, 2016) e que realizaram o mesmo ensaio no subcutâneo de ratos Wistar obtiveram resultados semelhantes aos encontrados em nosso estudo. Com isso, poder-se-ia supostamente afirmar que a HAP apresentou biocompatibilidade no subcutâneo, fato esse que encorajou a realizar o próximo teste de biocompatibilidade: o teste da calvária.

De acordo com os resultados do teste da calvária, o biomaterial não provocou danos locais no tecido ósseo implantado, promovendo um processo inflamatório nos grupos CAL 7 e CAL 15, seguida de uma consolidação óssea dos grupos CTL e CAL 30. Resultado semelhante foi demonstrado por Silva e col. (2005), que compararam o implante de HAP autóloga e sintética em defeitos na calvária de ratos Wistar. Observaram que os grupos nos quais tiveram o implante de HAP sintética tiveram quase que totalmente o preenchimento do defeito com tecido ósseo neoformado na 24ª semana do experimento.

Em seres humanos a HAP de origem bovina (*Bio-Oss*) já vem sendo utilizada para levantamento de seio maxilar (Berglundh & Lindhe, 1997; Emam *et al.*, 2011; Kurkcu *et al.*, 2012). Em modelos animais, estudos promissores na calvária de ratos (Al-Askar *et al.*, 2016) demonstraram a consolidação do defeito ósseo com Bio-Oss.

Dessa forma, a HAP proveniente do resíduo de corvina (*Micropogonias furnieri*), uma vez constatada a sua biocompatibilidade no tecido vivo, traria um novo bioproduto proveniente do descarte de alimentos. Portanto, trata-se de uma proposta veiculada à sustentabilidade ambiental e o desenvolvimento de um produto com menor custo, quando comparado com as outras HAP comerciais.

Portanto, podemos afirmar que a HAP proveniente do resíduo de pescado é biocompatível *in vivo*, uma vez que não alterou o percurso normal do processo inflamatório e não apresentou danos locais no tecido subcutâneo e ósseo, como necrose ou atipias celulares. No entanto, deve-se ainda realizar mais experimentos com o biomaterial, visando sua utilização na clínica em procedimentos terapêuticos de reconstrução óssea.

7. CONCLUSÃO

Podemos afirmar que a hidroxiapatita obtida do resíduo de corvina parece ser biocompatível em organismos vivos, uma vez que não alterou o processo inflamatório e permitiu o remodelamento tecidual no teste do subcutâneo e a consolidação óssea no teste da calvária. No entanto, deve-se ainda ser estudada com tempos experimentais mais longos, além de outras análises, com a finalidade de comprovar com maior segurança a sua capacidade de auxiliar na consolidação óssea.

8. REFERÊNCIAS


1. AL-ASKAR, M. et al. Guided Bone Regeneration in Standardized Calvarial Defects in Rats Using Bio-Oss and β -Tricalcium Phosphate with Adjunct Platelet-Derived Growth Factor Therapy: A Real-Time In Vivo Microcomputed Tomographic, Biomechanical, and Histologic Analysis. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 36, p. s61-73, 2016.
2. ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. In: Seminars in immunology. **Academic Press**, 2008. p. 86-100.
3. ARAUJO, T. S.; LIMA, T. A. R. M.; VALÉRIO, M. E. G. **Scientia Plena**, 3(7), 285, 2007.
4. ARRUDA, L. F. **Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para obtenção de silagem e óleo como subprodutos**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2004.
5. BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss®. An experimental study in the dog. **Clinical Oral Implants Research**, v. 8, n. 2, p. 117-124, 1997.
6. COSTA, A. C. F. M.; LIMA, M. G.; LIMA, L. H. M. A.; CORDEIRO, V. V.; VIANA, K. M. S.; SOUZA, C. V.; LIRA, H. L. **Remap**, 2009, 4.3, 29.
7. DOS SANTOS, Norival Ferreira. **Processamento, caracterização química e nutricional da silagem biológica de resíduos de pescado para uso em alimentação animal**. 2000.
8. EMAM, H. et al. Microcomputed tomographic and histologic analysis of anorganic bone matrix coupled with cell-binding peptide suspended in sodium hyaluronate carrier after sinus augmentation: a clinical study. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 26, n. 3, 2011.
9. ENKE, D. B. S.; SOARES, L. A. S. Obtenção e caracterização de farinhas de silagem ácida de resíduo de corvina (*Micropogonias furniere*) com e sem farelo de arroz. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: RBHSA**, v. 10, n. 1, p. 103-116, 2016.
10. FENG, W.; MU-SEN, L.; YU-PENG, L.; YONG-XIN, Q. **Materials Letters**, 59, 916-919; 2006.
11. FERRARO, V.; CRUZA, I. B.; JORGE, R. F.; MALCATA, F. X.; PINTADO, M. E.; CASTRO, P. M. L. **Food Research International**, 2010, 43, 2221.

12. FILION, T. M. et al. In vivo tissue responses to thermal-responsive shape memory polymer nanocomposites. **Biomaterials**, v. 32, n. 4, p. 985-991, 2011.
13. GHANAATI, S. et al. Histological and histomorphometrical analysis of a silica matrix embedded nanocrystalline hydroxyapatite bone substitute using the subcutaneous implantation model in Wistar rats. **Biomedical Materials**, v. 5, n. 3, p. 035005, 2010.
14. ITOH, S.; NAKAMURA, S.; KOBAYASHI, T.; SHINOMIYA, K.; YAMASHITA, K.; ITOH, S. **Calcif Tissue Int.**; 78:133–142; 2006.
15. IWASAKI, T.; TANAKA, Y.; NAKAMURA, M.; NAGAI, A.; KATAYAMA, K.; YAMASHITA, K. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, 116; [1]; 23-27; 2008.
16. KHASHABA, R. M. et al. The response of subcutaneous connective tissue to newly developed calcium phosphate-based root canal sealers. **International endodontic journal**, v. 44, n. 4, p. 342-352, 2011.
17. KIM, S. K.; MENDIS, E. **Food Research International**, 2006, 39, 383.
18. KIRK-OTHMER. **Encyclopedia of Chemical Technology**, Wiley Interscience, 2006, 18, 836.
19. KURKCU, M. et al. Anorganic bovine-derived hydroxyapatite vs β -tricalcium phosphate in sinus augmentation: a comparative histomorphometric study. **Journal of Oral Implantology**, v. 38, n. S1, p. 519-526, 2012.
20. KUSRINI, E.; SONTANG, M. **Radiation Physics and Chemistry** 81; 118–125; 2012.
21. LI, D. et al. Enhanced biocompatibility of PLGA nanofibers with gelatin/nano-hydroxyapatite bone biomimetics incorporation. **ACS applied materials & interfaces**, v. 6, n. 12, p. 9402-9410, 2014.
22. MONDAL, S. et al. Physico-chemical characterization and biological response of Labeo rohita-derived hydroxyapatite scaffold. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 37, n. 7, p. 1233-1240, 2014.
23. OHBA, S.; WANG, W.; ITOH, S.; TAKAGI, Y.; NAGAI, A.; YAMASHITA, K. **Acta Biomaterialia**. 8; 2778–2787, 2012.
24. OZAWA, M.; SUZUKI, S.; J. **Am. Ceram. Soc.** 85[5] 1315–17; 2002.
25. PADUANO, F. et al. Decellularized bone extracellular matrix and human dental pulp stem cells as a construct for bone regeneration. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 28, n. 8, p. 730-748, 2017.
26. PETROVIĆ, V. et al. Biocompatibility of new nanostructural materials based on active silicate systems and hydroxyapatite: in vitro and in vivo study. **International Endodontic Journal**, v. 48, n. 10, p. 966-975, 2015.

27. PICCIRILLO, C.; SILVA, M. F.; PULLAR, R. C.; CRUZ, I. B.; JORGE, R.; PINTADO, M. M. E.; CASTRO, P. M. L.; **Materials Science and Engineering**. C33; 103-110; 2013.
28. PRABAKARAN, K.; RAJESWARI, S.; **Trends Biomater. Artif. Organs**, 2006, 20(1), 20.
29. SEBRAE – Serviço de Apoio a Micro e Pequenas Empresas - **Viabilidade Econômica e Financeira do Reaproveitamento do Resíduo do Pescado no Espírito Santo**, 2011.
30. SILVA, R. V.; CAMILLI, J. A.; BERTRAN, C. A.; MOREIRA, N. H. The use of hydroxyapatite and autogenous cancellous bone grafts to repair bone defects in rats. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 34, n. 2, p. 178-184, 2005.
31. VAN HOUTT, Claire I. A. et al. Bone regeneration and gene expression in bone defects under healthy and osteoporotic bone conditions using two commercially available bone graft substitutes. **Biomedical Materials**, v. 10, n. 3, p. 035003, 2015.
32. VELNAR, T. et al. Biomaterials and host versus graft response: a short review. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**. 1840-4812, 2016.
33. ZHONG, Q. et al. Degradation pattern of porous CaCO_3 and hydroxyapatite microspheres in vitro and in vivo for potential application in bone tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 143, p. 56-63, 2016.

9. ANEXOS

Anexo I – Carta de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)


São Paulo, 07 de novembro de 2013
CEUA N **231533**

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): Hirochi Iamamura
Depto/Disc: Biociências
Daniel Araki Ribeiro (orientador)

Título do projeto: "BIOCOMPATIBILIDADE DA HIDROXIAPATITA OBTIDA A PARTIR DE OSSOS DE PEIXE: ANALISES IN VITRO E IN VIVO".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

Esse trabalho tem como objetivo o aproveitamento de resíduo de filetagem de pescado como fonte de hidroxiapatita biocompatível para uso em enxerto ósseo. Além disso, avaliar-se-á o comportamento biológico local e sistêmico da hidroxiapatita voltada para a reconstrução de tecido ósseo. A avaliação biológica será realizada por meio de testes de citotoxicidade e genotoxicidade in vitro e de efeitos teciduais após implantação in vivo. Esses métodos são fundamentais na avaliação da biocompatibilidade de biomateriais.

ANIMAIS: Serão utilizados:
36 Ratos Wistar, Machos, Peso: 250g, idade: 6 semanas
Procedência: CEDEME Unifesp
Manutenção: Guarda de Animais do Departamento de Biociências da UNIFESP Campus Baixada Santista

VIGÊNCIA DO ESTUDO: início previsto para: 08/2013 com término previsto para: 12/02015

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 24/10/2013, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo